

German Patent Office  
Federal Republic of  
Germany

**Patentschrift**  
**DE 44 35 107 C1**

Int. Cl. 6  
**C 12 M 1/38**  
C 12 P 19/34

File No: P 44 35 107.0-41  
Filing Date: 9-30-94  
OS publication Date: -  
Date of issue: 4-4-96

73. Applicant: Biometra biomedizinische Analytik GmbH, 37079 Göttingen, DE, Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V. 07743 Jena	72. Inventor: Baier, Volker, 07745 Jena, DE; Bodner, Ulrich, Dr., 37139 Adelsleben, DE; Dillner, Ulrich, Dr., 07743 Jena; Köhler, Johann Michael, Dr., 07743 Jena, DE; Poser, Siegfried, 07749 Jena, DE; Schimkat, Dieter, Dr., 37083 Göttingen
74. Representative: R. Pfeiffer und Kollegen, 07743 Jena	

54. Miniaturized flow thermocycler

57. The invention relates to a miniaturized flow thermocycler for performing thermally controlled biochemical and molecular-biologic processes, respectively, in particular of polymerase chain reactions. It is the object of invention to provide a miniaturized thermocycler which is adapted to carry out more effectively in particular the method of the polymerase-chain reaction, to evade the problem of parasitic heat capacities and which can be manufactured cost-effectively and in series. The object is inventionally realized in that a sample receiving range (1) is designed meander shaped multifold wound in a plane, wherein the sample receiving range (1) is formed by indentations provided in a wall, said indentations being closed by a cover and respective comparable sections of indentations are alternatingly captured by spaced apart heating zones (2) and cooling zones (3).



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Patentschrift  
10 DE 44 35 107 C 1

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 M 1/38  
C 12 P 19/34

21 Aktenzeichen: P 44 35 107.0-41  
22 Anmeldetag: 30. 9. 94  
43 Offenlegungstag: —  
46 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 4. 4. 96

DE 44 35 107 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Biometra biomedizinische Analytik GmbH, 37079  
Göttingen, DE; Institut für Physikalische  
Hochtechnologie eV, 07743 Jena, DE

74 Vertreter:

R. Pfeiffer und Kollegen, 07743 Jena

72 Erfinder:

Baier, Volker, 07745 Jena, DE; Bodner, Ulrich, Dr.,  
37139 Adelebsen, DE; Dillner, Ulrich, Dr., 07743 Jena,  
DE; Köhler, Johann Michael, Dr., 07743 Jena, DE;  
Poser, Siegfried, 07749 Jena, DE; Schimkat, Dieter,  
Dr., 37083 Göttingen, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 52 70 183

54 Miniaturisierter Fluß-Thermocycler

57 Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Fluß-Thermo-  
cycler zur Durchführung von thermisch kontrollierten, bio-  
chemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbe-  
sondere von Polymerase-Ketten-Reaktionen. Die Aufgabe  
der Erfindung, einen miniaturisierten Thermocycler anzuge-  
ben, der insbesondere das Verfahren der Polymerase-Ket-  
ten-Reaktion effektiver durchführen läßt, der das Problem  
parasitärer Wärmekapazitäten umgeht und der sich kosten-  
ünstig und serienmäßig herstellen läßt, wird erfindungsge-  
mäß dadurch gelöst, daß ein Probenaufnahmebereich (1) in  
einer Ebene mehrfach mäanderrförmig gewunden ausgeführt  
ist, wobei der Probenaufnahmebereich (1) durch in eine  
Wandung eingebrachte Gräben gebildet ist, die durch eine  
Abdeckung verschlossen, und jeweils vergleichbare Graben-  
abschnitte von voneinander beabstandet angeordneten  
Heizzonen (2) und Kühlzonen (3) alternierend erfaßt sind.

DE 44 35 107 C 1

Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Fluß-Thermocycler, der bei thermisch zu kontrollierenden, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbesondere beim Verfahren der sogenannten Polymerase-Ketten-Reaktion, bei dem aus einem Gemisch von DNA-Sequenzen bestimmte Sequenzen vervielfacht werden, Anwendung findet.

Bei der Durchführung von thermisch kontrollierten, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen sind häufig Prozeßschritte mit unterschiedlicher Temperaturbeaufschlagung erforderlich. Von besonderer Bedeutung sind solche wechselnden Temperaturbeaufschlagungen bei der sogenannten Polymerase-Ketten-Reaktion.

Das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion ist in den letzten Jahren zur Vervielfachung bestimmter DNA-Sequenzen entwickelt worden und in seinen Grundsätzen von Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. in "Molekulare Zellbiologie, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1994, S. 256/257" ausgeführt. Unter anderem ist bei diesem Verfahren wesentlich, daß Gemische aus DNA-Sequenzen einer definierten Temperaturwechselbehandlung unterworfen werden. Dazu finden stationäre Probenbehandlungsapparaturen Verwendung, bei denen die entsprechenden Proben in Probenkammern eingegeben und periodisch einem Wann-Kalt-Temperaturzyklus unterworfen werden, wobei sich je nach definiert vorgegebenen Primern die jeweils gewünschten DNA-Sequenzen vervielfachen. Die Effektivität bislang bekannter Probenkammern wird dabei als nicht ausreichend angesehen. Aus diesem Grund ist in jüngster Zeit eine miniaturisierte Probenkammer vorgeschlagen worden (Northrup et al., DNA Amplification with Microfabricated reaction chamber, 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Proc. Transducers 1993, S. 924–26), die eine vierfach schnellere Vervielfachung gewünschter DNA-Sequenzen gegenüber bekannten Anordnungen ermöglicht. Diese bis zu 50 µl Probenflüssigkeit aufnehmende Probenkammer besteht aus einer strukturierten Siliziumzelle mit einer Längsausdehnung in der Größenordnung von 10 mm, welche in einer Probenangriffsrichtung von einer dünnen Membran abgeschlossen ist, über die die entsprechende Temperaturbeaufschlagung mittels miniaturisierter Heizelemente erfolgt. Auch bei dieser Vorrichtung wird die zu vervielfachende DNA-Sequenz über Mikrokanäle in die Kammer eingebracht, einer Polymerase-Ketten-Reaktion unterworfen und anschließend wieder abgezogen. Trotz der mit dieser Vorrichtung erzielten Vorteile haftet ihr im wesentlichen der Nachteil an, daß auch diese Probenkammer als Ganzes beheizt und gekühlt werden muß, womit sich nur begrenzte Temperaturwechselraten erreichen lassen. Insbesondere bei weiterer Reduzierung der Probengröße fällt dabei die parasitäre Wärmekapazität der Probenkammer und ggf. eines notwendigen Temperierblocks gegenüber der Probenflüssigkeit immer stärker ins Gewicht, so daß die prinzipiell bei kleinen Flüssigkeitsvolumina denkbaren hohen Temperaturwechselraten nicht erreicht werden können, wodurch die Effektivität des Verfahrens relativ gering bleibt. Darüber hinaus ist zwecks Erreichung jeweils konstanter Temperaturregimes für die Probenflüssigkeit ein relativ aufwendiger Steuer- und Regelaufwand erforderlich, wobei die erbrachte Heiz- bzw. Kühlleistung im wesentlichen nicht in der Probenflüssigkeit, sondern in den sie umgebenden Baugruppen verbraucht

wird.

Desweiteren ist aus US-PS 5,270,183 ein im Durchflußprinzip arbeitender Thermocycler bekannt geworden. Bei dem die zu amplifizierende Probenflüssigkeit durch eine Rohrleitung geschickt wird, welche nacheinander um mehrere, auf unterschiedlichen Temperaturen gehaltene Zylinder ein oder mehrfach aufgewickelt ist. Grundsätzlich sind mit einer solchen Ausbildung auch relativ kleine Probenmengen, bis herunter zu ca. 25 µl, amplifizierbar. Eine derartige Vorrichtung ist in ihrer Handhabung jedoch recht unpraktikabel und erfordert eine hohe Kunstfertigkeit vom Gerätehersteller, so daß sie für eine Serienfertigung gänzlich ungeeignet ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen miniaturisierten Thermocycler anzugeben, der thermisch kontrollierte, biochemische bzw. molekularbiologische Prozesse, insbesondere das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion, effektiver als nach dem Stand der Technik durchführen läßt, der das Problem parasitärer Wärmekapazitäten umgeht und der sich kostengünstig herstellen läßt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch das Kennzeichen des Patentanspruchs 1 gelöst. Der Erfindung liegt der Gedanke zugrunde, aus der sogenannten Mikrosystemtechnik bekannte Strukturierungstechnologien anzuwenden, um eine Probenaufnahme-kammer zu schaffen, die eine dynamische Probenbehandlung auch sehr kleiner Mengen, z. T. sehr teurer, Materialien, ermöglicht.

Durch die erfindungsgemäße Gestaltung des Probenaufnahmebereiches ist weiterhin gewährleistet, daß die in jeweils vorgesehenen Heiz- und Kühlzonen gerade einer Behandlung unterworfenen Probenanteile volumina einen homogenen Temperaturdurchsatz erfahren, was ebenfalls eine Ausbeuteerhöhung der zu amplifizierenden Substanz bewirkt. Weiterhin wird durch den anordnungsbedingten Wegfall von Heiz- und Kühlprozessen der Wandungsmaterialien und die drastische Minimierung parasitärer Wärmekapazitäten und Wärmeeinflüsse nicht nur ein erheblich geringerer Steuer- und Regelaufwand erforderlich, sondern der Gesamtprozeßdurchlauf erfährt auch eine wesentliche Zeitverkürzung. Dabei braucht jeweils nur soviel Heiz- und Kühlleistung eingespeist zu werden, wie im Probenflüssigkeitsstrom transportiert wird. Darüber hinaus ermöglicht die erfindungsgemäße Thermocyclerausbildung nicht nur eine kontinuierliche Prozeßführung, sondern auch einen seriellen Betrieb, indem unterschiedliche Substanzen nacheinander dem Thermocycler zuführbar sind, ohne daß es zu störenden Vermischungen mit der noch in der Anordnung befindlichen Probe kommen würde, was sich problemlos durch Einbringung eines kleinen Gas-puffervolumens bewerkstelligen läßt. Alle genannten Vorteile gewährleisten ebenso, daß das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion automatisiert durchgeführt werden kann. Weiterhin ergibt sich eine leichte Kombinierbarkeit mit anderen Verfahren, wie z. B. der Mikro-Gel-Elektrophorese, Mikro-Kapillar-Chromatografie und anderen Mikro-Trenn- und Charakterisierungsverfahren.

Zur näheren Illustration der Erfindung sollen nachfolgende Ausführungsbeispiele dienen. Es zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf eine erfindungsgemäße Probenkammer, bei der ein Probenflüssigkeitsweg durch mikrostrukturierte Flußwege gebildet ist und

Fig. 2 einen seitlichen Schnitt durch eine Probenkammer gemäß Fig. 1.

In Fig. 1 ist eine erfindungsgemäße Probenkammer,

bei der ein Probenflüssigkeitsweg durch mikrostrukturierte Flußwege gebildet ist, schematisch dargestellt. Fig. 2 zeigt diese Ausbildung nicht maßstäblich im seitlichen Schnitt. Bei dieser Ausführungsform sind in eine ca. 10 · 15 mm große und 500 µm dicke Platte 10, aus Silizium oder Glas bestehend, Gräben 8, die im Beispiel parallel ausgeführt sind, durch naßchemisches Ätzen eingebracht. Ebenso können statt genannter Gräben 8 auch vollständige Durchbrüche vorgesehen sein, wobei der verbleibende Rahmen dann einseitig ganzflächig mit einer geschlossenen Platte zu verschließen wäre. Die offenen liegenden Grabenbereiche werden im Beispiel im weiteren von einer Abdeckung 9, die die Baugruppen oberhalb einer Achse X-X, wie in Fig. 4 dargestellt, umfaßt, verschlossen. Die Abdeckung 9 ist dabei in erfindungsgemäßer Weise aus einem Siliziumplättchen gebildet, in das im Beispiel zwei thermisch isolierende Kehlungen 12 eingebracht sind. Diese Kehlungen 12 bilden an ihrer Basis einen membranartigen Abschluß 13, der die Grabenbereiche, die die Verweilzonen der Probenflüssigkeit zwischen Heiz- und Kühlzonen bilden, abdeckt und ca. 1 µm dick ist. In der Fig. 2 ist der mittlere Siliziumsteg mit einem Dünnschichttheizelement 15 versehen, mittels dessen die Probenaufheizung an der gegenüberliegenden Stegbasis realisiert wird. Über die im Beispiel verbleibenden zwei äußeren Siliziumstege wird jeweils eine thermostatisierte, nicht näher dargestellte Kühlung vorgenommen. Ein durchgängiger Probenfluß ist im Beispiel durch die in der Abdeckung 9 eingebrachte Überbrückungskanäle 11 gewährleistet, die wechselseitig Einzelgrabenanfänge mit den jeweils benachbarten Einzelgrabenenden verbinden. Erforderliche Zu- und Abläufe sind entweder in der Platte 10 (wie in Fig. 1 angedeutet) oder die Abdeckung 9 einbringbar. Die beschriebene Gesamtvorrichtung ist im Beispiel mit einem Träger 16 versehen, der aus einem Glas mit niedriger Wärmeleitfähigkeit gefertigt ist. Im Beispiel sind den Einzelgräben 8 Grabenbreiten von 500 µm und Grabenlängen von etwas unter 100 mm bei Grabentiefen von 400 µm gegeben, wodurch sich inklusive der Wege für die Überbrückungskanäle eine Gesamtgrabenlänge von 0,4 m ergibt. Dabei sind sinnvollerweise Probenvolumina von ca. 10 bis 200 µl in den Fluß-Thermocycler einbringbar, was bisher üblichen Probemengen entspricht. Da durch die angegebenen Grabendimensionierungen die Möglichkeiten der Mikrolithografie bei weitem noch nicht ausgeschöpft sind, sind für gewünschte Anwendungsfälle auch Dimensionierungen bereits heute herstellbar, die die Einbringung eines Probenvolumens in der Größenordnung von 0,1 µl zulassen würden.

Mit dem zu Fig. 1 und 2 gehörigen Ausführungsbeispiel sind bei möglichen Flußraten von ca. 0,1 µl/s, bei Probenverweilzeiten in den Heizzonenbereichen von ca. 20 sec, in den Kühlzonenbereichen von 30 sec und in den dazwischenliegenden Zonen von 10 sec, bei einer Einzelgrabenanzahl von 40, Gesamtdurchlaufzeiten zur Amplifizierung mit maximal möglicher Ausbeute von 40 min erreichbar, was eine deutliche Reduzierung unter die bisher bekannt gewordenen geringsten Zeiten bei gleichzeitig erhöhter Ausbeute bedeutet.

In diesem Beispiel kann die Heizzone im Rahmen der Erfindung so ausgebildet sein, daß sie in zwei Teilbereiche derart aufgeteilt ist, daß in Flußrichtung eine erste Heizzone von bspw. 4 mm Breite entsteht, an die sich eine nicht dargestellte thermische Isolationszone von 1 mm und daran eine zweite Heizzone mit 2 mm Ausdehnung anschließt. Auf diese Weise ist genannte erste

Heizzone über Einstellung einer entsprechenden Heizleistung mit einer Temperatur von 72°C und die zweite Heizzone mit einer Temperatur von 92°C beaufschlagbar. An genannte zweite Heizzone könnte eine zweite thermische Isolationszone von bspw. 1 mm Ausdehnung folgen, an die sich eine Kühlzone von bspw. 3 mm Ausdehnung anschließt, die durch sekundäre Kühlung auf 55°C gehalten wird. Ein derart ausgebildeter miniaturisierter Thermocycler ist besonders zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion geeignet. Dabei wird am Zulauf ein Gemisch aus Template, Nukleosidtriphosphaten, Primern und taq-Polymerase in Pufferlösung appliziert, deren jeweilige Zusammensetzung analog zum bekannten Stand der Technik festgelegt wird. Die Flußrate wird auf ca. 8 µl/min eingestellt, so daß die Verweilzeit je Periode etwa 1 Minute beträgt. Davon entfallen auf genannte erste Heizzone 20 sec, 10 sec auf die zweite Heizzone, 15 sec auf die Kühlzone und jeweils 5 sec auf die thermischen Isolationszonen. Zum Durchlauf des gesamten miniaturisierten Thermocyclers werden damit ca. 40 Minuten benötigt. In dieser Zeit finden in einem Volumenelement von 2 µl vierzig Amplifikationszyklen statt. Bei einer Verlängerung auf 44 Minuten (10% Zeitverlängerung) werden 34 µl amplifiziert.

Die erfindungsgemäße Probenkammer läßt sich problemlos einer Serienfertigung zuführen und ist kostengünstig, bei gleichzeitig großer Vielfalt unterschiedlicher Probenkammergeometrien herstellbar, so daß eine Anpassung für variierende Anwendungsfälle keine weiteren Schwierigkeiten mit sich bringt.

#### Bezugszeichenliste

- 1 Probenaufnahmebereich
- 2 Heizzone
- 3 Kühlzone
- 6 Zulauf
- 7 Ablauf
- 8 Graben
- 9 Abdeckung
- 10 Silizium- oder Glasplättchen
- 11 Überbrückungskanäle
- 12 isolierende Kehlung
- 13 membranartiger Abschluß
- 14 Siliziumsteg
- 15 Dünnschichttheizelement
- 16 Träger
- X-X Achse

#### Patentansprüche

1. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler, einen Probenaufnahmebereich (1) zur Aufnahme und Durchleitung von flüssigen Medien und wenigstens je eine Heizzone (2) und eine Kühlzone (3) beinhaltend, die in thermischem Kontakt zum Probenaufnahmebereich stehen, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenaufnahmebereich (1) in einer Ebene mehrfach mäanderförmig gewunden ausgeführt ist, wobei der Probenaufnahmebereich (1) durch in eine Wandung eingebrachte Gräben gebildet ist, die durch eine Abdeckung verschlossen, und Grabenabschnitte von voneinander beabstandet angeordneten Heizzonen (2) und Kühlzonen (3) alternierend erfaßt sind.
2. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Wan-

dung durch ein Silizium- bzw. Glasplättchen (10) gebildet ist, in die die Gräben (8) parallel eingätzt sind, welche an ihren Enden untereinander durch Überbrückungskanäle (11), die vorzugsweise in eine die Gräben verschließende Abdeckung (9) eingebracht sind, in eine durchgehende Verbindung gebracht sind, wobei der durch die Gräben (8) und die Überbrückungskanäle (11) gebildete Flußweg von mindestens je einer Heizzone (2) und einer Kühlzone (3) erfaßt ist.

3. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß genannte Abdeckung (9) aus einem Siliziumplättchen gefertigt ist, dem probenflußabseitig zwischen Heizzone(n)- und Kühlzonenbereichen wenigstens eine thermisch isolierende Kehlung (12) gegeben ist, die in Richtung der Gräben (8) einen membranartigen Abschluß (13) bildet.

4. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß genannte Heizzone(n) (2) oder Kühlzone(n) (3) in Probendurchflußrichtung jeweils gleich lange Probendurchflußabschnitte erfassen.

5. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest die Heizzone(n) (2) in voneinander beabstandete Bereiche aufteilbar ist (sind), die mit unterschiedlichen Temperaturen beaufschlagbar sind.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

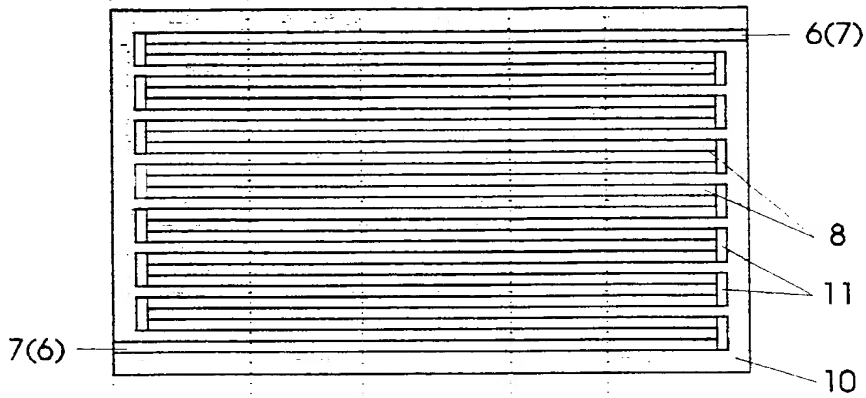


Fig. 1

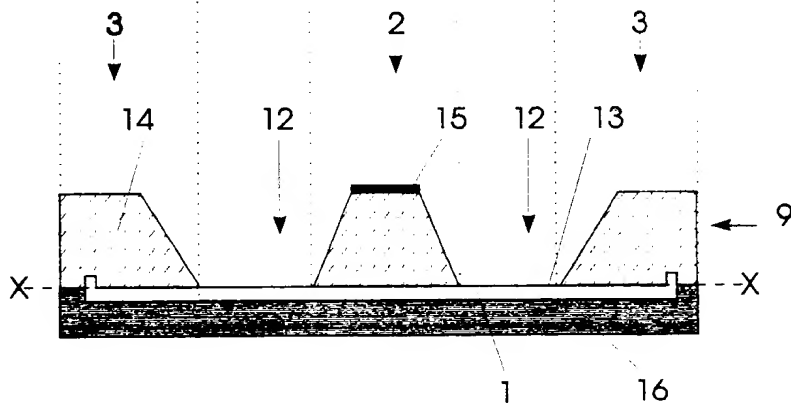


Fig. 2